

---

## 西野瑞穂歯科臨床医学奨励賞受賞講演

---

### 培養歯髓細胞における *Streptococcus mutans* および炎症性サイトカインによる CCL20 の発現

高橋 加奈子

キーワード：CCL20, 内皮細胞, 歯髓線維芽細胞, 歯髓炎

### CCL20 Production is Induced in Human Dental Pulp upon Stimulation by *Streptococcus Mutans* and Proinflammatory Cytokines

Kanako TAKAHASHI

**Abstract :** Introduction: Pulpitis is characterized as a marked infiltration of inflammatory cells in response to an invasion of caries-related bacteria. It is well known that chemokines regulate the trafficking of lymphocytes, and CC chemokine ligand 20 (CCL20) has been recently shown to play a crucial role in the recruitment of memory T cells and immature dendritic cells into inflammatory lesions. We previously reported that CCL20 was mainly expressed in microvasculature endothelial cells and macrophages accumulated in inflamed pulp tissues and its specific receptor; CCR6, was expressed on infiltrated lymphocytes. However, the mechanism of CCL20 expression remains unclear.

**Methods and Results:** In this study, we investigated the expression of CCL20 in monocytes/macrophages, endothelial cells and pulpal fibroblasts after stimulation with *Streptococcus mutans*, a representative of caries-related bacteria, or pro-inflammatory cytokines. CCL20 mRNA was detected in inflamed pulp, but not in clinically normal pulp by reverse transcription-polymerase chain reaction. *S. mutans* induced human monocytic cells (THP-1), macrophage-like THP-1 differentiated with phorbol myristate acetate, and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to produce an increased level of CCL20 as demonstrated by enzyme-linked immunosorbent assay. Lipoteichoic acid from *S. mutans* also elicited CCL20 production by HUVEC. Moreover, CCL20 production from cultured pulpal fibroblasts was increased by the stimulation with interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ .

**Conclusion:** Our results indicate that CCL20 expression is induced by stimulation with caries-related bacteria invaded deeply into dentinal tubules and pro-inflammatory cytokines in inflamed pulpal lesions and may be involved in the progression of pulpitis via accumulation of inflammatory cells.

#### 1. はじめに

歯髓には樹状細胞や常在性マクロファージ, T リンパ球といった免疫担当細胞が常時存在することが知られており<sup>1)</sup>, う蝕の進展に伴う細菌侵襲により免疫応答が

順次惹起されて歯髓炎が成立するものと考えられている<sup>1-5)</sup>。事実, 浅在性象牙質う蝕病巣では, 歯髓炎の初期反応と考えられる樹状細胞の限局性の集積がう蝕侵襲部に相当する象牙芽細胞近傍に認められ<sup>2)</sup>, さらにう蝕

細菌が象牙質の深部にまで侵入し歯髄に近接すると、リンパ球、マクロファージ、好中球などの炎症性細胞浸潤が認められるようになる<sup>3)</sup>。炎症病変、すなわち歯髄炎となる。リンパ球は炎症歯髄におけるその細胞浸潤の中心的存在であり、特にT細胞は主たるリンパ球ポピュレーションであることから<sup>5-6)</sup>、歯髄炎の成立に重要な役割を果たしていると考えられる。一般的に、炎症局所に集積したT細胞はCD45RA（ナイーブT細胞マーカー）よりもCD45RO（メモリーT細胞マーカー）を優位に発現していることが知られており<sup>7)</sup>、歯髄炎でもCD45RO発現細胞の集積が示唆されている<sup>5)</sup>。このような炎症局所部位へのメモリーT細胞の血管外遊走には、走化因子であるケモカイン等が重要な役割を果たしていることが報告されている<sup>8)</sup>。

ケモカインは白血球走化性・活性化作用を有し、塩基性でヘパリン結合性の強いタンパク質群で、炎症反応のみならず造血制御や血管新生などさまざまな生命現象に密接に関与することが知られている<sup>9-13)</sup>。歯髄炎におけるケモカインの発現に関する報告については、IL-8の発現細胞は象牙芽細胞や単核細胞であるというHuangらの報告<sup>14)</sup>や、正常な象牙芽細胞層においてもIL-8のmRNA発現が認められるというLevinらの報告<sup>15)</sup>がある。しかしながら、歯髄炎の炎症局所におけるケモカインの発現とリンパ球浸潤・組織破壊・病態形成との関連についてはいまだに不明な点が多い。

ケモカインはシステイン残基の位置から大きくCXC, CC, CX<sub>3</sub>Cの3つのサブファミリーに分類されるが、近

年、CCケモカインファミリーに属する新しいケモカインCC Chemokine Ligand 20（以下、CCL20と略す）が同定された<sup>16)</sup>。CCL20は、小腸、大腸、虫垂などの腸管組織<sup>17, 18)</sup>、表皮角化細胞や真皮の微小血管内皮細胞などの皮膚組織<sup>19)</sup>、リンパ節<sup>17)</sup>、扁桃<sup>20)</sup>などに発現しており、アレルギー性気管支炎や皮膚疾患の一つである乾癬においてその発現が増強されている<sup>21, 22)</sup>。しかしながら、歯髄炎での発現はいまだに不明で、病態形成との関連に興味を持たれる。また、CCL20の特異的なCCケモカインレセプターであるCCR6は、メモリー/活性化T細胞、未成熟樹状細胞、ナイーブB細胞に発現しており、それらの細胞はCCL20に対して遊走活性を有していることが報告されている<sup>20, 23)</sup>。しかしながら、歯髄炎の病変局所へのリンパ球の浸潤におけるCCR6の役割についても不明である。本稿では、歯髄炎病変局所におけるCCL20の発現パターンとその役割を解析すべく検討を行った結果を述べる。

## 2. 歯髄組織におけるCCL20, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ の遺伝子発現

RT-PCR法によりCCL20遺伝子の発現は、炎症歯髄組織では9症例中3症例に認められたが、臨床的正常歯髄組織では明確な発現は認められなかった。また、IL-8やIL-1 $\beta$ の遺伝子発現は、臨床的正常歯髄組織にくらべ、炎症歯髄組織でより強く認められたが、TNF- $\alpha$ 遺伝子の発現については明らかな差異は認められなかった（図1）。

表1 PCRに用いた特異的プライマーの塩基配列

mRNA species	Primer	Sequence	AT <sup>a</sup> (°C)	Size (bp)
CCL20	sense	5'-TTGCTCCTGGCTGCTTTG-3'	54	367
	antisense	5'-ACCCTCCATGATGTGCAAG-3'		
IL-8	sense	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3'	60	294
	antisense	5'-TCTCAGCCCTCTCAAAAACCTTCTC-3'		
IL-1 $\beta$	sense	5'-ATGGCAGAAGTACCTAAGCTCGC-3'	60	804
	antisense	5'-ACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGTT-3'		
TNF- $\alpha$	sense	5'-TTGCTCCTGGCTGCTTTG-3'	60	446
	antisense	5'-ACCCTCCATGATGTGCAAG-3'		
ICAM-1	sense	5'-CGTGCCGCACTGAACTGGAC-3'	60	447
	antisense	5'-CCTCACACTTCACTGTACCT-3'		
VCAM-1	sense	5'-ATTGGGAAAAACAGAAAAGAG-3'	56	642
	antisense	5'-GGCAACATTGACATAAAGT-3'		
GAPDH	sense	5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3'	60	983
	antisense	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'		

<sup>a</sup>AT, annealing temperature.

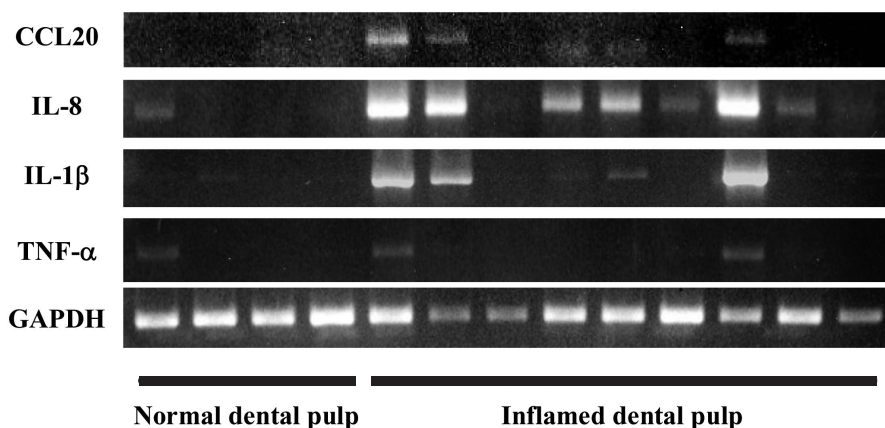


図1 臨床的正常歯髄組織および炎症歯髄組織における CCL20, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の遺伝子発現  
歯髄組織から total RNA を抽出し, CCL20, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。CCL20 の遺伝子発現は, 炎症歯髄組織では 9 症例中 3 症例に認められたが, 臨床的正常歯髄組織では全ての症例において明確な発現は認められなかった。また, IL-8 や IL-1 $\beta$  の遺伝子発現は, 臨床的正常歯髄組織にくらべ, 炎症歯髄組織でより強く認められた。これらに対して, TNF- $\alpha$  の遺伝子発現については, 明らかな差は認められなかった。

### 3. *Streptococcus mutans* が THP-1 細胞からの CCL20 および各サイトカイン産生に及ぼす影響

RT-PCR 法, ELISA 法により, 単芽球細胞である THP-1 細胞を代表的な歯関連細菌の *S. mutans* で一定時間刺激すると, CCL20, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  の mRNA レベルにおける発現誘導 (図 2 A) およびタンパクレベルにおける産生上昇 (図 2 B) が認められた。また, THP-1 細胞を phorbol myristate acetate (PMA) にてマクロファージ様細胞に分化させたのち, 生菌状態の *S. mutans* で刺激すると, mRNA レベルにおいて CCL20 の発現増強が認められたが, 熱処理により不活性された *S. mutans* による影響は認められず (図 3 A), タンパクレベルにおいても同様の傾向が認められた (図 3 B)。

### 4. HUVEC からの CCL20 および接着分子の産生

以前に我々は, 炎症歯髄組織において CCL20 が歯髄血管内皮細胞に局在していることを報告しており<sup>24)</sup>, 炎症性細胞浸潤を伴う疾患である歯髄炎において, 血管内皮細胞は炎症性細胞の供給に大きな役割を果たし, さらに炎症局所へのリンパ球の血管外遊出や細胞浸潤に, 様々な接着分子やケモカインが関与していることが考えられる。

*S. mutans* で HUVEC を一定時間刺激し RT-PCR 法にて検討したところ, CCL20 は 4,000 MOI (multiplicity of infection) で刺激したときのみ持続的な遺伝子発現が認められ, さらに VCAM-1 では全ての菌濃度において刺激後 24 時間でその発現が認められたが, ICAM-1 発現における *S. mutans* の影響は認められなかった (図 4 A)。

また, 培養上清中の CCL20 タンパク濃度を ELISA 法にて定量したところ, 刺激後 24 時間で菌の濃度に依存して CCL20 タンパク濃度の有意な上昇が認められた (図 4 B)。

次にグラム陽性菌の表面構成成分であるリポタイコ酸 (LTA) が血管内皮細胞に及ぼす影響を解析するため, *S. mutans* 由来 LTA を用いて HUVEC を刺激し, CCL20 および VCAM-1, ICAM-1 の遺伝子発現を RT-PCR 法にて解析した。mRNA レベルにおいて CCL20 発現は, LTA 濃度 10 $\mu$ g / ml で刺激後 24 時間, 100 $\mu$ g / ml で刺激後 12 時間から 24 時間まで認められ, また VCAM-1 の発現は, LTA 濃度 10 $\mu$ g / ml で刺激後 12 時間, 100 $\mu$ g / ml で刺激後 12 時間から 24 時間まで認められた (図 5 A)。また, 培養上清中においても刺激後 24 時間で LTA の濃度に依存して CCL20 タンパク濃度の有意な上昇が認められた (図 5 B)。

### 5. 歯髄細胞からの CCL20 および IL-8 の産生

歯髄組織の大部分を構成する歯髄線維芽細胞は, 細菌性因子による影響を受けると, 炎症性サイトカインや組織破壊因子などを産生することが知られており, 不可逆性歯髄炎と診断された歯髄組織においても IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  レベルが健常歯髄と比較して有意に上昇していることが報告されている<sup>25, 26)</sup>。歯髄細胞を IL-1 $\beta$  で刺激すると, タンパクレベルにおいて CCL20 および好中球遊走因子である IL-8 の時間依存的な産生誘導が認められ, この傾向は TNF- $\alpha$  にて歯髄細胞を刺激しても同様であった (図 6 A)。

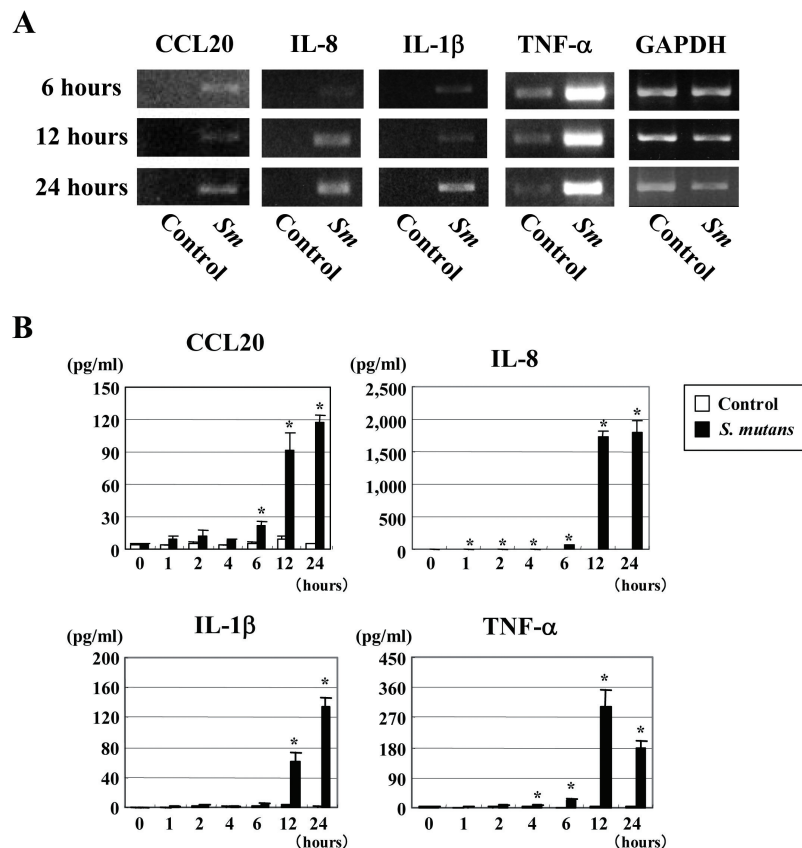


図2 *S. mutans* 刺激による単芽球 THP-1 細胞からの CCL20 や IL-8, 炎症性サイトカインの遺伝子発現 (A) およびタンパク産生 (B)

(A) THP-1 細胞を *S. mutans* (400 MOI) にて経時的に刺激した後, total RNA を回収し CCL20, IL-8, IL-1β, TNF-α の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。*S. mutans* 刺激により mRNA レベルにおける全ての発現誘導が認められた。

(B) THP-1 細胞を *S. mutans* (400 MOI) にて刺激し, 培養上清中の CCL20, IL-8, IL-1β, TNF-α のタンパク濃度を ELISA 法にて定量した。タンパクレベルにおいても全ての産生上昇が認められた。

\*  $p < 0.05$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

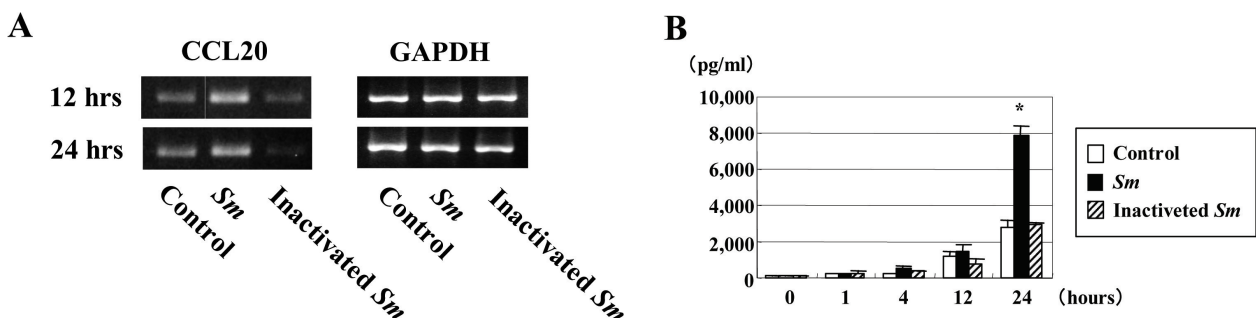


図3 *S. mutans* 刺激によるマクロファージ様 THP-1 細胞からの CCL20 遺伝子発現 (A) およびタンパク産生 (B)

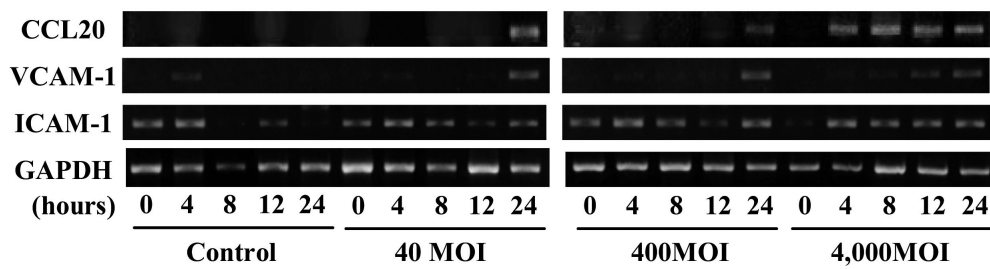
(A) PMA により分化させたマクロファージ様 THP-1 細胞を *S. mutans* (400 MOI) にて刺激した後, total RNA を回収し CCL20 の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。生菌状態の *S. mutans* 刺激により CCL20 の発現は持続的に認められたが, 不活化された *S. mutans* による影響は認められなかった。

(B) マクロファージ様 THP-1 細胞を *S. mutans* (400 MOI) にて刺激し, 培養上清中の CCL20 タンパク濃度を ELISA 法にて定量したところ, 生菌状態の *S. mutans* で刺激24時間後に CCL20 タンパクの産生上昇が認められた。

\*  $p < 0.05$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。



## A



## B

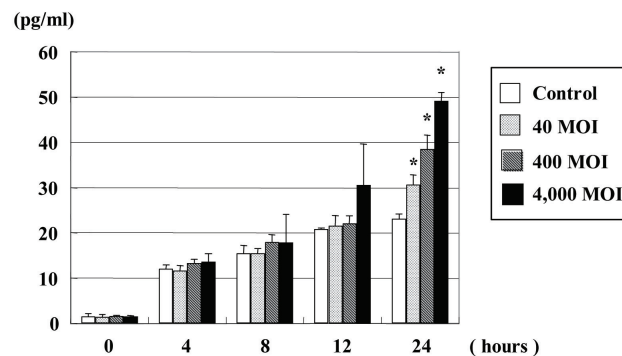
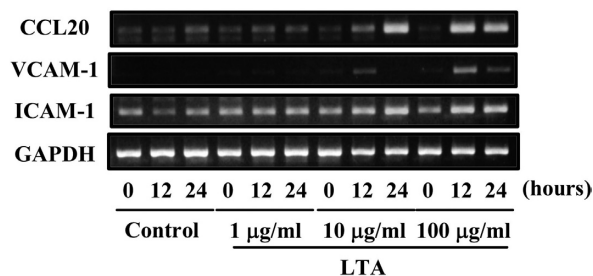


図4 *S. mutans* 刺激による HUVEC の CCL20 および接着分子の遺伝子発現 (A) および CCL20 のタンパク産生 (B)  
 (A) HUVEC を各菌濃度の *S. mutans* で経時的に刺激した後, total RNA を回収し, CCL20, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現を RT-PCR 法によって解析した。4,000 MOI 濃度で刺激したときのみ, 刺激後 4 時間から 24 時間まで CCL20 遺伝子の発現誘導が認められた。また, VCAM-1 の遺伝子発現は, 刺激後 24 時間で, 全ての菌濃度において認められた。なお, ICAM-1 の遺伝子発現における *S. mutans* の影響は認められなかった。  
 (B) HUVEC を同様に *S. mutans* で刺激した後, 培養上清を回収し, CCL20 タンパク濃度を ELISA 法によって定量した。刺激後 24 時間で *S. mutans* の濃度に依存して, CCL20 タンパクの産生上昇が認められた。  
 \*  $p < 0.05$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

## A



## B

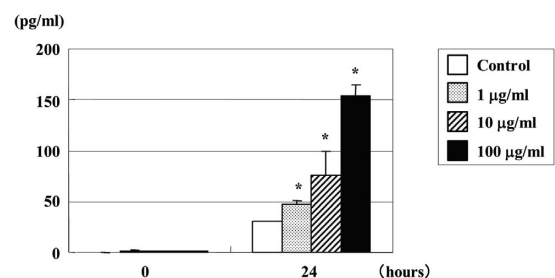
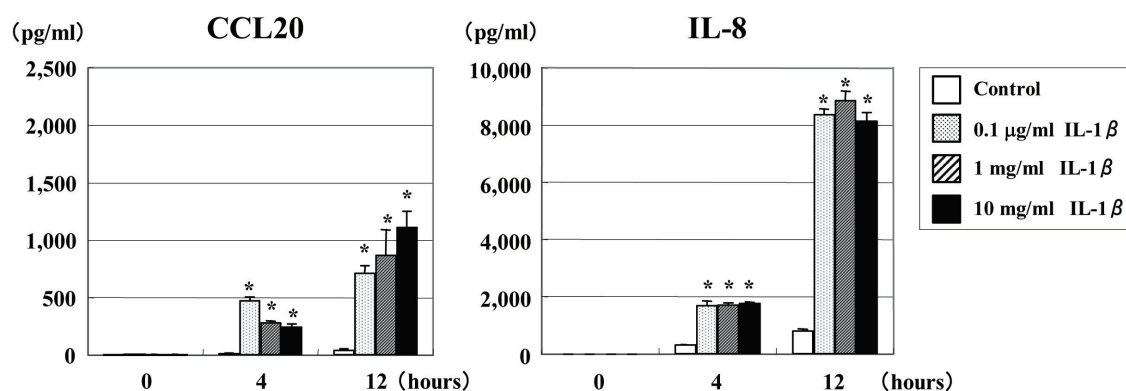


図5 *S. mutans* LTA 刺激による HUVEC の CCL20 および接着分子の遺伝子発現 (A) および CCL20 タンパクの産生 (B)  
 (A) HUVEC を *S. mutans* 由来 LTA で一定時間刺激した後, total RNA を回収し, CCL20, ICAM-1, VCAM-1 の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。10 µg / ml の LTA では刺激後 24 時間で, 100 µg / ml の LTA では刺激後 12 時間および 24 時間で CCL20 遺伝子の発現誘導が認められた。また, VCAM-1 の遺伝子発現は, 10 µg / ml の LTA では刺激後 12 時間で, 100 µg / ml の LTA では刺激後 12 時間および 24 時間で認められた。また, ICAM-1 の遺伝子発現における *S. mutans* LTA の影響は認められなかった。  
 (B) HUVEC を同様に *S. mutans* LTA で刺激した後, 培養上清を回収し, CCL20 タンパク濃度を ELISA 法により定量した。刺激後 24 時間で LTA の濃度に依存して, CCL20 タンパク濃度の上昇が認められた。  
 \*  $p < 0.05$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

A



B

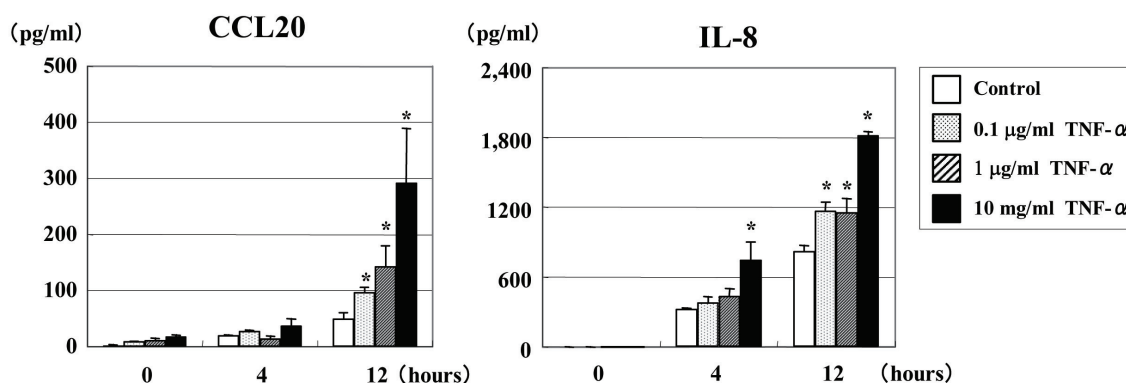


図6 サイトカイン刺激による歯髄細胞のCCL20およびIL-8産生

- (A) 歯髄細胞をIL-1βで4, 12時間刺激した後、培養上清を回収し、CCL20およびIL-8のタンパク濃度をELISA法により測定した。IL-1βで歯髄細胞を刺激したときのCCL20およびIL-8のタンパク濃度は、刺激後4時間から12時間まで、コントロールにくらべ上昇した。
- (B) 歯髄細胞をTNF-αで4, 12時間刺激した後、培養上清を回収し、CCL20およびIL-8のタンパク濃度をELISA法により解析した。TNF-αで歯髄細胞を刺激すると、刺激後12時間でTNF-αの濃度に依存してCCL20のタンパク濃度の上昇を認めた。また、IL-8タンパク濃度は、10ng/mlのTNF-α刺激により、刺激後4時間でコントロールに比べ上昇した。また、全ての濃度のTNF-α刺激において、刺激後12時間でコントロールにくらべ上昇した。

\*  $p < 0.05$ ; 無刺激コントロールと比較して有意差を認めた。

## 6. まとめ

近年、CCL20はメモリーT細胞の浸潤に重要な役割を担っていることが明らかになってきた<sup>27, 28)</sup>。Liaoらは*in vitro*において、CCL20がT細胞のメモリーサブセットを特異的に集積させることを報告している<sup>23)</sup>。多数のリンパ球浸潤が認められる歯髄炎においても、CCL20はその浸潤に重要な働きをしていると推察される。CCL20は乾癬やアトピー性皮膚炎においてその発現が報告されているが、その主たる産生細胞として、病巣局所の上皮細胞が挙げられている<sup>22, 28, 29)</sup>。Tanakaらも、LPSを投与したマウスの腸管上皮細胞においてCCL20が誘導されることを報告しており<sup>30)</sup>、CCL20産生細胞と

して上皮細胞が有力と考えられるが、歯髄組織には通常上皮細胞が存在していない。我々は以前に歯髄炎におけるCCL20産生細胞を免疫組織化学的に解析し、CCL20が炎症歯髄組織に浸潤したマクロファージや血管内皮細胞から産生されることを報告した<sup>24)</sup>。これは他の組織でのCCL20発現パターンと異なっており、この差異が歯髄炎の病態形成にどのように影響しているを検討することが今後の課題の一つであろう。

マクロファージや血管内皮細胞のCCL20発現のメカニズムを明らかにする目的で、代表的な口腔関連細菌である*S. mutans*がこれらの細胞に作用し、CCL20を産生しうるかどうかを*in vitro*の系において検討した結

果, PMA によりマクロファージ様に分化させた THP-1 細胞から CCL20 が産生され (図 3 A, B), この結果は Schutyser らの報告<sup>31)</sup>と一致しており, 歯髄炎においてもマクロファージは恒常的に CCL20 を産生している可能性が考えられる。さらに生菌の *S. mutans* 刺激により, 単芽球 THP-1 細胞およびマクロファージ様 THP-1 細胞の両者において CCL20 の発現誘導が認められた (図 2, 3)。これらのことから単球が血管から遊走し, 歯髄内で細菌刺激を受けマクロファージに分化しながら CCL20 を発現し, 増強していることが推察される。

う蝕の進行に伴い歯髄炎が発症・進行すると, 細菌侵襲に対する生体防御として歯髄組織に炎症性細胞浸潤が認められるようになる。一般に, リンパ球の炎症部位への集積はケモカインおよび接着分子により調節されており<sup>8, 32)</sup>, CCL20 はリンパ球と血管内皮細胞との接着に関与することにより, リンパ球浸潤に重要な働きをすることが報告されている<sup>27, 33)</sup>。中西らは免疫組織化学的な検索により炎症歯髄血管内皮細胞が CCL20 を発現しており, 歯髄炎においても炎症性細胞の供給に血管内皮細胞の CCL20 発現が重要であることを示している<sup>24)</sup>。*S. mutans* が血管内皮細胞の CCL20 発現に及ぼす影響について検討したところ, *S. mutans* の刺激により血管内皮細胞からの CCL20 の発現増強を認めた (図 4)。このメカニズムを解析する目的で, 血管内皮細胞に対する *S. mutans* の LTA の影響を検討したところ, CCL20 の産生増強が認められた (図 5)。これらの結果は, う蝕による露髄部から侵入した細菌が歯髄組織内に拡散し, 細菌自体や菌体表面の LTA を介して血管内皮細胞からの CCL20 産生を促進している可能性を示している。なお, 血管内皮細胞の活性化を判定する指標として, 接着分子である ICAM-1 および VCAM-1 の遺伝子レベルの発現についても検索したところ, *S. mutans* や *S. mutans* 由来 LTA 刺激による VCAM-1 の発現誘導を認めた (図 4 A, 図 5 A)。VCAM-1 は, 免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子であり, IL-1 や TNF- $\alpha$  で内皮細胞を活性化することによって発現し, 炎症部位へのリンパ球浸潤に関与するとされており<sup>34)</sup>, *S. mutans* によっても VCAM-1 の発現を介して, 局所へのリンパ球を集積させる可能性が考えられる。

また, 歯髄線維芽細胞もサイトカイン刺激に対して CCL20 産生能を有することが明らかとなった (図 6)。これまでに, 皮膚組織由来線維芽細胞や慢性関節リウマチ組織由来線維芽細胞様細胞, 変形性関節症組織由来線維芽細胞様細胞, 角膜組織由来線維芽細胞においても IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  に対して CCL20 発現誘導が増強されることが報告されている<sup>22, 35-38)</sup>。しかしながら, *S. mutans* による歯髄線維芽細胞の CCL20 発現を検討したところ, 全く CCL20 発現を確認できなかった (data not shown)。これまでに炎症歯髄組織中の線維芽細胞が CCL20 を発現しているとの報告はないが, 炎症性細胞の集積部位に

歯髄線維芽細胞が存在していることから考えても, マクロファージなどから産生されるサイトカインの刺激を受けた歯髄線維芽細胞が CCL20 の供給源となっている可能性は否定できない。

今回の結果には示していないがマクロファージ様 THP-1 細胞を生菌 *S. mutans* で刺激すると, 好中球遊走因子である IL-8 の発現誘導を認めた。THP-1 細胞における IL-8 の産生は *Streptococcus intermedius* 刺激または *Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* の LPS 刺激によって認められることが報告されている<sup>39, 40)</sup>。一方, 末梢血から分離した単核球を *S. mutans* で刺激すると mRNA レベルでの IL-8 の発現誘導は認められるものの, タンパク産生については *Porphyromonas gingivalis* や *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の方が強い IL-8 の誘導能を有すると報告されており<sup>41)</sup>, マクロファージにおいてもこのような菌種間における反応性の違いがあることが推察される。今後 *Lactobacillus* など *S. mutans* 以外のう蝕細菌に対するマクロファージや血管内皮細胞, 歯髄線維芽細胞の CCL20 産生を検討していくことが重要な課題であろう。

近年, 歯髄炎から波及することの多い歯根肉芽腫において, MIP-1 $\alpha$  (CCR5 リガンド), MIP-1 $\beta$  (CCR5 リガンド), interferon- $\gamma$ -inducible protein (IP)-10 (CXCR3 リガンド) といったケモカインやそれらのレセプターである CCR5 あるいは CXCR3 発現細胞が高頻度に観察されているとの報告があり<sup>42)</sup>, 歯髄炎の病態形成における CCL20 以外のケモカインの果たす役割にも興味を持たれる。今後, CCL20 のみならず他のケモカインやケモカイン-ケモカインレセプターとのネットワークが, どのように炎症性細胞の浸潤, そして歯髄炎の不可逆化へ関与するのかを明らかにすることが今後の課題と考えられる。

## 参考文献

- 1) Hahn CL, Best AM and Tew JG: Cytokine induction by streptococcus mutans and pulpal pathogenesis. Infect Immun 68, 6785-6789 (2000)
- 2) Sakurai K, Okiji T and Suda H: Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dental caries-affected regions of the human dental pulp; an immunohistochemical study. J Dent Res 78, 1596-1608 (1999)
- 3) Reeves R and Stanley HR: The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. Oral Surg 22, 59-65 (1966)
- 4) Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA and Hunter N: Quantitative microbiological study of human carious dentin by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. J Clin Microbiol 40, 1698-1704 (2002)
- 5) Izumi T, Kobayashi I, Okamura K and Sakai H:

- Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Archs Oral Biol* 40, 609-614 (1995)
- 6) Hahn CL, Falkler WA and Siegel MA: A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 15, 20-26 (1989)
  - 7) Pitzalis C, Kingsley G, Haskard D and Panayi G: The preferential accumulation of helper inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion. *Eur J Immunol* 18, 1397-1404 (1988)
  - 8) Butcher EC and Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272, 60-66 (1996)
  - 9) Oppenheim JJ: Overview of chemokines. *Adv Exp Med Biol* 351, 183-186 (1993)
  - 10) Wolpe SD and Cerami A: Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J* 14, 2565-2573 (1989)
  - 11) Broxmeyer HE, Sherry B, Lu L, Cooper S, Oh KO, Tekamp-Olson P, Kwon BS and Cerami A: Enhancing and suppressing effects of recombinant murine macrophage inflammatory proteins on colony formation in vitro by bone marrow myeloid progenitor cells. *Blood* 76, 1110-1116 (1990)
  - 12) Graham GJ, Wright EG, Hewick R, Wolpe SD, Wilkie NM, Donaldson D, Lorimore S and Pragnell IB: Identification and characterization of an inhibitor of haemopoietic stem cell proliferation. *Nature* 6265, 442-444 (1990)
  - 13) Broxmeyer HE, Sherry B, Cooper S, Lu L, Maze R, Beckmann MP, Cerami A and Ralph P: Comparative analysis of the human macrophage inflammatory protein family of cytokines (chemokines) on proliferation of human myeloid progenitor cells. Interacting effects involving suppression, synergistic suppression. *J Immunol* 150, 3448-3458 (1993)
  - 14) Huang GT, Potente AP, Kim JW, Chugal N and Zhang X: Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 88, 214-220 (1999)
  - 15) Levin LG, Rudd A, Bletsa A and Reisner R: Expression of IL-8 by cells of the odontoblast layer *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 107, 131-137 (1999)
  - 16) Hromas R, Gray PW, Chantry D, Godiska R, Krathwohl M, Fife K, Bell GI, Takeda J, Aronica S, Gordon M, Cooper S, Broxmeyer HE and Klemsz MJ: Cloning and characterization of exodus, a novel  $\beta$ -chemokine. *Blood* 89, 3315-3322 (1997)
  - 17) Rossi DL, Vicari P, Bacon KF, McClanahan T and Zlotnik A: Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines. *J Immunol* 158, 1033-1036 (1997)
  - 18) Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, Varki NM and Kagnoff F: Regulated MIP-3 $\alpha$ /CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G710-G719 (2001)
  - 19) Nakayama T, Fujisawa R, Yamada H, Horikawa T, Kawasaki H, Hieshima K, Izawa D, Fujiie S, Tezuka T and Yoshie O: Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation- regulated chemokine (LARC) /macrophage inflammatory protein (MIP) -3 $\alpha$ /CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. *Int Immunol* 13, 95-103 (2001)
  - 20) Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Yahia SA, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S and Caux C: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386 (1998)
  - 21) Lukacs NW, Prosser DM, Wiekowski M, Lira SA and Cook DN: Requirement for chemokine receptor CCR6 in allergic pulmonary inflammation. *J Exp Med* 194, 551-555 (2001)
  - 22) Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Carton D, Buchanan ME, Muller A, Malefyt RW, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C and Zlotnik A: Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 164, 6621-6632 (2000)
  - 23) Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB and Farber JM: CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subset of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$ . *J Immunol* 162, 186-194 (1999)
  - 24) Nakanishi T, Takahashi K, Hosokawa Y, Adachi T, Nakae H and Matsuo T: Expression of macrophage inflammatory protein 3  $\alpha$  in human inflamed dental pulp tissue. *J Endod* 31, 84-87 (2005)
  - 25) Barkhordar RA, Ghani QP, Russell TR and Hussain MZ: Interleukin-1  $\beta$  activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. *J Endod* 28, 157-159 (2002)
  - 26) Pezelj-Ribaric S, Anic I, Brekalo I, Miletic I, Hasan M and Simunovic-Soskic M: Detection of tumor necrosis factor  $\alpha$  in normal and inflamed human dental pulps. *Arch Med Res* 33, 482-484 (2002)
  - 27) Fitzhubh DJ, Naik S, Caughman SW and Hwang ST: C-C chemokine receptor 6 is essential for arrest of a subset of memory T cells on activated dermal microvascular endothelial cells under physiological flow conditions *in*



- vitro*. J Immunol 165, 6677-6681 (2000)
- 28) Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Zlotnik A and Cauz C: Macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$  is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. J Exp Med 192, 705-717 (2000)
- 29) Schmuth M, Neyer S, Rainer C, Grassegger A, Fritsch P, Romani N and Heufler C: Expression of the C-C chemokine MIP-3 $\alpha$ /CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. Exp Dermatol 11, 135-142 (2002)
- 30) Tanaka Y, Imai T, Baba M, Ishikawa I, Uehira M, Nomiyama H and Yoshie O: Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. Eur J Immunol 29, 633-642 (1999)
- 31) Schutysen E, Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Conings R, Put W, Wuyts A, Proost P and Damme JV: Regulated production and molecular diversity of human liver and activation-regulated chemokine/ macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  from normal and transformed cells. J Immunol 165, 4470-4477 (2000)
- 32) Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaïss F, Heimchen UM and Stahl RA: Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/ macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. Kidney Int 51, 211-223 (1997)
- 33) Campbell J, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA and Butcher EC: Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. Science 279, 381-384 (1998)
- 34) Osborn L, Hession C, Tizard R, Vassallo C, Luhowskyj S, Chi-Rosso G and Lobb R: Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. Cell 59, 1203-1211 (1989)
- 35) Chabaud M, Page G and Miossec P: Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF- $\alpha$  on macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  production in rheumatoid arthritis: Regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. J Immunol 167, 6015-6020 (2001)
- 36) Matsui T, Akahoshi T, Namai R, Hashimoto A, Kurihara Y, Rana M, Nishimura A, Endo H, Kitasato H, Kawai S, Takagishi K and Kondo H: Selective recruitment of CCR6-expressing cells by increased production of MIP-3 $\alpha$  in rheumatoid arthritis. Clin Exp Immunol 125, 155-161 (2001)
- 37) Mabajan VB, Wei C and McDonnell III PJ: Microarray analysis of corneal fibroblast gene expression after interleukin-1 treatment. Invest Ophthalmol Vis Sci 43, 2143-2151 (2002)
- 38) Ruth JH, Shahrara S, Park CC, Morel JCM, Kumar P, Qin S and Koch AE: Role of macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$  and its ligand CCR6 in rheumatoid arthritis. Lab Invest 83, 579-588 (2003)
- 39) Petersen FC, Pasco S, Ogier J, Klein JP, Assev S and Scheie AA: Expression and functional properties of the Streptococcus intermedius surface protein antigen I/II. Infect Immun 69, 4647-4653 (2001)
- 40) Baquì AA, Meiller TF and Falkler WA: Enhanced interleukin-8 production in THP-1 human monocytic cells by lipopolysaccharide from oral microorganisms and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Oral Microbiol Immunol 14, 275-280 (1999)
- 41) Jiang Y, Russell TR, Graves DT, Cheng H, Nong SH and Levitz SM: Monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 production in mononuclear cells stimulated by oral microorganisms. Infect Immun 64, 4450-4455 (1996)
- 42) Kabashima H, Yoneda M, Nagata K, Hirofujii T, Ishihara Y, Yamashita M and Maeda K: The presence of chemokine receptor (CCR5, CXCR3, CCR3) -positive cells and chemokine (MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IP-10) -positive cells in human periapical granulomas. Cytokine 16, 62-66 (2001)